基础研究

肠道病毒71型对Vero细胞线粒体的损伤作用及机制

林佩欣[1],申　洪[1],高璐璐[1],黄业恩[1],张耀忠[1],陈　清[2]
南方医科大学[1]基础医学院病理学系,[2]公共卫生与热带医学学院流行病学系,广东　广州　510515

摘要:目的 探讨肠道病毒71型(EV71)对Vero细胞的损伤作用及机制,为分析EV71的致病机制提供新思路。**方法** 将临床分离的一株EV71接种于Vero细胞,观察细胞的形态改变,用免疫荧光方法检测EV71抗原在Vero细胞中的表达,用透射电镜观察Vero细胞超微结构的改变,用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件测试分析病毒颗粒直径和面积密度以及空泡化线粒体的比例和面积密度。**结果** EV71感染后Vero细胞形态发生改变,由梭形变为圆形或死亡,免疫荧光检测显示EV71抗原定位于胞质,超微结构观察可见胞质中有大量呈团块状分布、晶格状排列的高电子密度病毒颗粒,颗粒平均直径为16.3 nm,平均面积密度为38.3%;线粒体肿胀、变性并空泡化、崩解,空泡化线粒体数量约占90.9%,平均面积密度为89.2%;部分线粒体内可见EV71病毒颗粒。**结论** EV71感染Vero细胞后在其胞质中增殖,并可侵入线粒体,导致线粒体直接损伤并致细胞死亡;线粒体是EV71在Vero细胞内的作用靶标。

关键词:肠道病毒71型;Vero细胞;超微结构;线粒体损伤

Mitochondrial injury in enterovirus 71-infected Vero cells and its mechanism

LIN Peixin[1], SHEN Hong[1], GAO Lulu[1], HUANG Yeen[1], ZHANG Yaozhong[1], CHEN Qing[2]
[1]Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, [2]Department of Epidemiology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the mitochondrial injury in enterovirus 71 (EV71)-infected Vero cells and explore the possible mechanism. **Methods** A clinical isolate of EV71 was inoculated to Vero cells and the EV71 antigen was detected by immunofluorescence assay. The morphological changes of Vero cells were observed using optical microscopy and transmission electron microscopy. The diameter and area density of the viral particles and the ratio and area density of vacuolated mitochondria in the cells were measured on the ultrastructural images. **Results** EV71-infected Vero cells underwent obvious changes and to a spherical morphology followed by cell death EV71 particles were detected in the cytoplasm by immunofluorescence. Ultrastructurally, the infected cells contained a large number of viral particles in the cytoplasm, with a clustered distribution and lattice-like arrangement. The diameter of the particles were 16.3 nm and the mean area density was 38.3% . Most of the mitochondria presented with swelling, vacuoles and degeneration. The ratio of the vacuolated mitochondria was 90.9% with a mean area density of 89.2%. Viral particles were also found in some mitochondria. **Conclusion** EV71 proliferates in the cytoplasm and invades the mitochondria of infected Vero cells leading to mitochondrial injury and cell death, suggesting that mitochondria are the targets for EV71 infection.

Key words: enterovirus 71; Vero cells; ultrastructure; mitochondrial injury

肠道病毒71型(Enterovirus 71, EV71)是引起手足口病的主要病原体,可致神经系统疾病,包括无菌性脑膜炎、脑干脑炎、小脑脑炎、急性弛缓性瘫痪等[1,2],导致患者终身瘫痪,甚至死亡,是继脊髓灰质炎病毒后最重要的嗜神经性肠道病毒。手足口病疫情暴发时,常有EV71感染引起手足口病重症和死亡的报道,对公共健康安全造成巨大的威胁[3-6]。虽然人们认识到EV71的致病性受多种因素影响,但在其致病机制方面还存在不少认识上的空白。EV71感染细胞后是在核内增殖还是在核外增殖?是首先导致细胞核损伤还是细胞质损伤?如果是损伤细胞质,那么其靶标是何种细胞器?机制又如何?这些问题的回答对于揭示EV71的致病机制有重要价值,有待明确。为此我们用从手足口病死亡病例标本中分离的EV71,通过接种Vero细胞,对上述问题进行了探讨。

收稿日期:2015-02-19
基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(K1014090);广东省自然科学基金(S2012010009540)
作者简介:林佩欣,硕士研究生,E-mail: three1988@163.com
通信作者:申　洪,博士,教授,E-mail: shenhong2010168@163.com

1　材料与方法

1.1　细胞和病毒

(1)Vero细胞:来自南方医科大学公共卫生与热带医学学院流行病学实验室;(2)EV71型病毒株:源自2008年一EV71感染手足口病死亡病例,序列号888/GZ/CHN/2008[4]。

1.2 病毒$TCID_{50}$的测定

消化Vero细胞，用DMEM完全培养基（含5%胎牛血清）调整细胞浓度为1×10^5个/mL，混匀后每孔0.1 mL，接种于96孔细胞培养板，置37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。待长满成单层后，每孔弃培养上清并用DMEM基础培养基将EV71病毒液10倍梯度依次稀释成10^{-1}~10^{-10}个浓度，每个稀释度设8孔，每孔接种0.1 mL，同时设不加病毒液的正常细胞作对照。37 ℃、5% CO_2培养箱中孵育1 h，取出培养板并弃病毒液，加入维持液（含2%胎牛血清的DMEM培养基）0.1 mL继续在37 ℃、5%CO_2培养箱中培养，每日在倒置显微镜下观察细胞病变（CPE），观察7~10 d，记录每个稀释度发生CPE的孔数。用Reed-Muench公式[7]计算病毒液的50%细胞感染剂量（median tissue culture infective dose，$TCID_{50}$）。

$$TCID_{50}=\text{CPE>50\%病毒稀释度}+\frac{CPE>50\%\text{的百分数}-50}{CPE>50\%\text{的百分数}-CPE<50\%\text{的百分数}}\times \lg 10 \quad (1)$$

1.3 Vero细胞经EV71感染后病毒的免疫荧光检测

将1×10^5个/mL的Vero细胞接种于铺好玻片的六孔培养板中，置37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。待长满单层后，弃上清并将0.3 mL EV71病毒液接种于培养板中。培养箱中吸附1h后，弃病毒液并PBS液洗涤2遍，加维持液（含2%胎牛血清的DMEM培养基）3 mL继续在37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。对照组采用培养基代替病毒液。每日在倒置显微镜下观察CPE，当75%细胞出现病变时，弃维持液，PBS洗涤2遍；4 %多聚甲醛固定30 min，PBS洗涤2遍。取出玻片，0.5% TritonX-100作用15 min以破膜，PBS洗涤后加正常山羊血清室温封闭30 min以抑制非特异反应。每张玻片滴加鼠源性EV71单克隆抗体（1∶2000，Millipore公司，美国），室温孵育2h，另用PBS代替EV71抗体作对照。PBS洗涤后，加荧光标记山羊抗小鼠IgG（1∶200，中杉金桥），暗盒中室温孵育1 h，PBS浸洗切片。滴加抗荧光淬灭封片剂（含DAPI），荧光显微镜下观察。

1.4 Vero细胞经EV71感染后的透射电镜观察

接种Vero细胞于25 cm^2培养瓶中，待细胞生长到培养瓶面积的80%，弃上清并加入0.5 mL EV71病毒液，于37 ℃、5% CO_2培养箱吸附1 h，PBS洗涤2遍以去除未吸附的病毒；加入1.5 mL维持液继续培养。当75%细胞出现病变时，用无菌刮子轻轻刮取细胞并用移液枪转移至1.5 mL的离心管中，1500 r/min，4 ℃离心10 min，弃上清，加预冷PBS温和洗涤1次，同上离心处理。弃上清并沿管壁缓慢加入预冷的2.5%的戊二醛0.5 mL，4 ℃固定2 h。常规电镜制样、超薄切片（50 nm）并透射电镜观察。

1.5 Vero细胞损伤的定量分析[8]

在透射电镜100 000倍下，随机取10个视野，用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件通过鼠标勾选每幅图像中的病毒颗粒及病毒增殖区（病毒颗粒聚集分布区域），测试病毒颗粒直径及病毒颗粒和病毒增殖区的面积；计数所有的线粒体及空泡化的线粒体并分别测试其面积[9]。有关计算公式如下：

（1）病毒颗粒面积密度（A_{AEV71}）

$$A_{AEV71}=\frac{\sum_{i=1}^{n}A_{EV71i}}{\sum_{i=1}^{n}A_{PVi}} \quad (2)$$

式中，A_{EV71i}表示被测胞质视野中第i个EV71病毒颗粒的面积，A_{PVi}表示被测胞质视野中第i个病毒增殖区的面积。

$$A_{EV71}=\pi r^2 \quad (3)$$

式中，A_{EV71}表示胞质中EV71病毒颗粒的面积，r为病毒颗粒半径。

（2）空泡化线粒体面积密度（A_{AVM}）

$$A_{AVM}=\frac{\sum_{i=1}^{n}A_{VMi}}{\sum_{i=1}^{n}A_{Mi}} \quad (4)$$

式中A_{VMi}表示被测胞质视野中第i个空泡化线粒体的面积，A_{Mi}表示被测胞质视野中第i个线粒体（包括空泡化和非空泡化）的面积。

2 结果

2.1 $TCID_{50}$检测结果

用Reed-Muench公式计算该EV71临床分离株的$TCID_{50}$，结果为$10^{-5.81}$/0.1 mL，即将病毒悬液作$10^{5.81}$倍稀释后，每孔接种0.1 mL，可使50% Vero细胞孔发生病变。普通光学显微镜下观察，可见未接种EV71的Vero细胞呈梭形贴壁生长，胞质透明度好（图1A）。EV71感染Vero细胞后，细胞变圆、皱缩，细胞间隙增大，随着感染时间的延长，病变细胞失去黏附性，脱落并漂浮于培养上清中（图1B）。

2.2 EV71在Vero细胞中的感染部位检查结果

免疫荧光检测显示，Vero细胞感染EV71后，EV71抗原位于细胞质中，而不是在细胞核内，提示EV71定居在感染的Vero细胞胞质中（图2）。

2.3 EV71在Vero细胞内的增殖及对Vero细胞损伤作用

EV71感染Vero细胞后，定位在细胞质并增殖，在细胞器间可见大量呈团分布、晶格状排列、大小较一致的高电子密度病毒颗粒。病毒颗粒呈球状，粒子外无突起（图3B、C）。对比未接种EV71的Vero细胞（图3A），EV71感染的Vero细胞胞质中出现大量空泡，线粒体肿

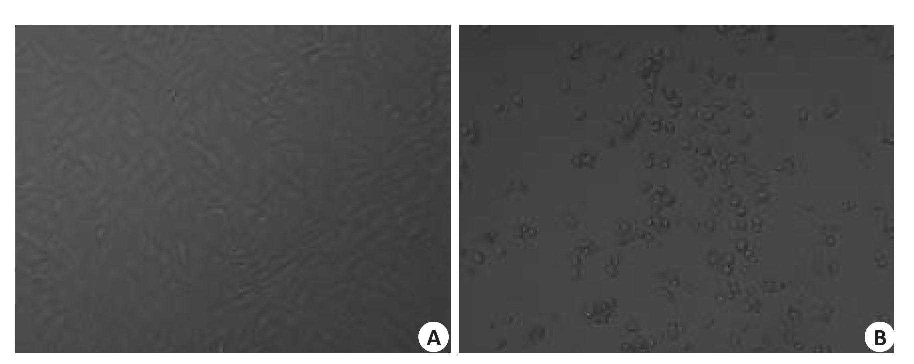


图1 Vero细胞经EV71感染后的光镜观察

Fig.1 Microscopical observation of EV71-infected Vero cells (Original magnification: ×20). *A*: Normal Vero cells; *B*: EV71-infected cells.

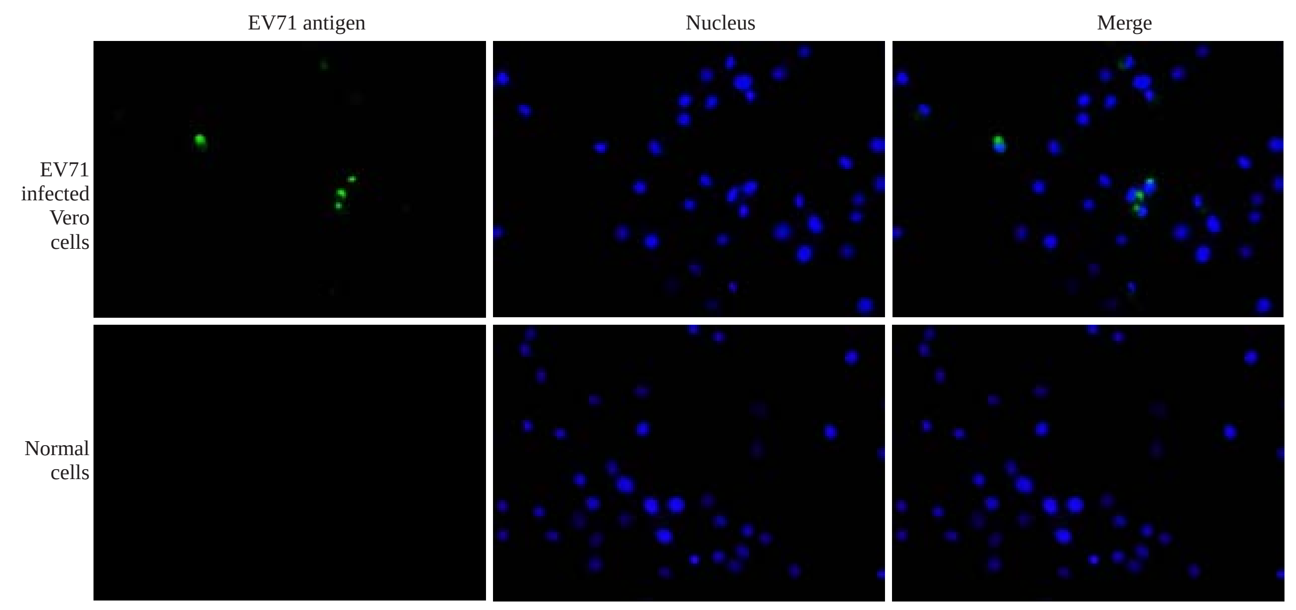


图2 Vero细胞经EV71感染后EV71抗原免疫荧光检测

Fig.2 EV71 antigen detection by immunofluorescence in EV71-infected Vero cells (Original magnification: × 20). Blue immunofluorescence signals represented the nucleus of the Vero cells, and green signals the EV71 antigens. EV71 antigens were detected in the cytoplasm of the infected cells.

胀、变性并明显空泡化，线粒体嵴断裂、减少，线粒体内可见散在或游离的病毒颗粒（图3B、C、D）。病变进一步发展，则可见细胞死亡，核消失，细胞膜也消失，呈现出大量微泡结构。

病毒团块中EV71的直径为14.79~20.00（16.29±1.63）nm，变异系数为10%；EV71的面积密度为（38.3±9.79）%，变异系数为26%。空泡化线粒体占所有线粒体的比例及其面积密度测试结果显示，空泡化线粒体数量占全部线粒体数量的（90.90±8.88）%，变异系数为10%；空泡化线粒体面积密度为（89.21±10.36）%，变异系数为12%。

3 讨论

EV71属小RNA病毒科肠道病毒属成员，是单股正链RNA病毒，为二十面体立体对称的球形结构，无包膜和突起，直径约为24~30 nm，由外层的衣壳和RNA核心构成[10]。Vero细胞是非洲绿猴肾细胞，繁殖快、营养要求低，易于培养，对多种病毒敏感，为EV71培养的宿主细胞[11]。本研究用分离自一手足口病死亡病例标本的EV71，接种于Vero细胞，观察Vero细胞感染后的形态学变化。

3.1 关于EV71在Vero细胞中的增殖部位及特点

本研究超微结构显示EV71在Vero细胞胞质中增殖，为大小较一致的高电子密度颗粒，呈团块状分布、晶格状排列，面积密度为24.6%~53.1%，是病毒大量增殖的典型超微结构特点[12]。细胞核内未见病毒颗粒。

3.2 关于EV71病毒颗粒的大小及其制样收缩问题

本研究观察测试结果显示EV71病毒颗粒通过常规透射电镜制样，其直径表现为14.79~20 nm，与文献报道的24~30 nm不同[13]。我们认为两者不矛盾，因为

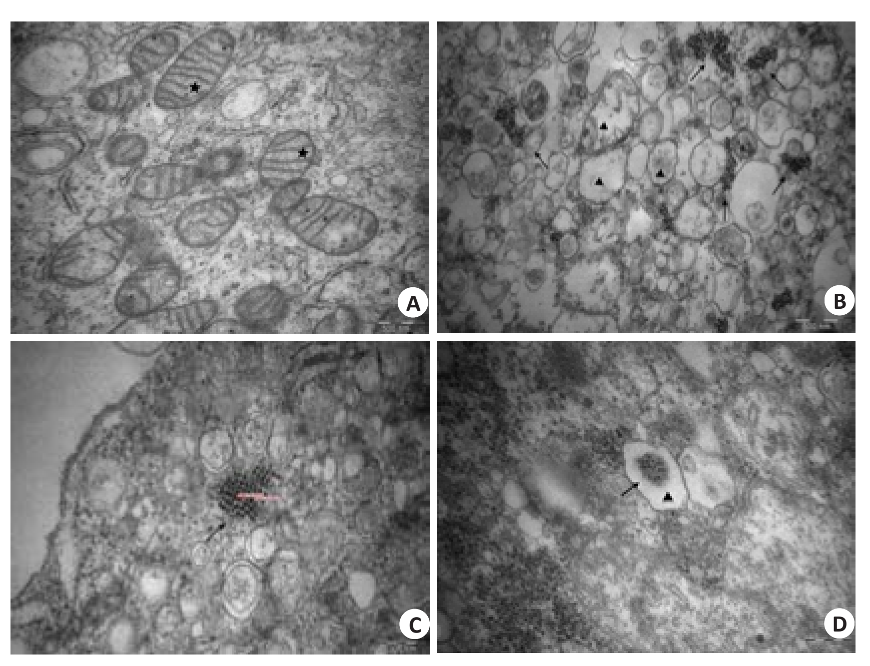


图3 Vero细胞经EV71感染后的超微结构改变

Fig.3 Ultrastructural changes of EV71-infected Vero cells. *A*: Uninfected Vero cells. The asterisks indicate normal mitochondria with normal mitochondrial cristae and complete mitochondrial membrane (Original magnification: ×50 000). *B, C*: Large numbers of viral particles (arrows) in the cytoplasm of EV71-infected Vero cells. The diameter of the viral particles was 15-20 nm. Most of the mitochondria showed swelling, vacuoles and degeneration (▲). *B*:(×60 000), *C*:(×100 000). *D*: Viral particles (arrows) in degenerated mitochondria (▲) (×100 000).

文献报道的结果为EV71非收缩状态下的大小。常规透射电镜制样过程中组织和细胞会收缩,如果我们按收缩系数为65%来计算,那么文献中报道的24~30 nm经收缩则为15.6~19.5 nm,与我们测得的数据基本吻合。这也提示EV71病毒颗粒在电镜制样过程中也会发生收缩,其收缩系数我们推测约为65%(60%~70%)。

3.3 关于胞质内EV71损伤的靶标

本研究EV71感染Vero细胞后,线粒体损伤显著,明显空泡化,其内可见EV71,提示线粒体是EV71的损伤靶标,EV71可直接损伤线粒体。线粒体损伤表现为线粒体嵴崩解断裂,线粒体空泡化,空泡化线粒体的数量可占到71%~100%;面积密度由69%~100%不等。研究发现, EV71感染胶质瘤细胞,引起细胞内活性氧生成,线粒体跨膜电位下降,影响呼吸链电子传递,从而导致细胞产能障碍[14]。EV71感染能通过半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspases)依赖的细胞凋亡途径,致线粒体内存在的凋亡相关因子释放出来[15],也可通过诱导线粒体Ca^{2+}内流,激活钙蛋白酶,促进线粒体内凋亡相关因子转移到宿主细胞核,导致细胞凋亡的发生[16]。但是,EV71是如何损伤线粒体的?其机制尚未认识清楚。本文根据超微结构的观察,首次提供了EV71可直接入侵宿主细胞线粒体造成线粒体结构损伤,导致细胞死亡的证据。

3.4 线粒体损伤对于EV71增殖的作用

线粒体损伤对EV71的增殖有何影响呢?本文认为线粒体损伤后释放出的DNA,降解形成核苷酸后可为EV71增殖提供所需的基本原料,有助于EV71的增殖。

3.5 关于EV71对Vero细胞的感染、损伤作用及其增殖循环过程

基于以上分析,我们提出EV71在Vero细胞中通过以下循环方式不断感染、增殖并损伤细胞的新机制。(1)EV71侵入Vero细胞;(2)EV71在Vero细胞胞质内增殖;(3)Vero细胞胞质内的EV71侵入线粒体并造成线粒体损伤,导致线粒体空泡化并崩解;(4)由于线粒体产能障碍,导致整个细胞功能障碍或丧失,细胞水肿并崩解死亡;此外,损伤的线粒体释放出的线粒体DNA,在胞质内降解成核苷酸,成为EV71增殖所需的基本原料,有助于EV71的进一步增殖;(5)死亡的Vero细胞崩解并释放出EV71,伺机感染新的宿主细胞或靶细胞。上述循环过程即是EV71的感染、增殖方式,也是其对Vero细胞的损伤方式及机制,本文将其概括为图4。我们猜测EV71在Vero细胞中的上述循环、增殖过程及对Vero细胞的损伤作用和机制或许同样存在于机体组织中。

虽然我们观察到EV71可感染Vero细胞并损伤其线粒体,但是EV71是如何侵入细胞的?是通过受体途

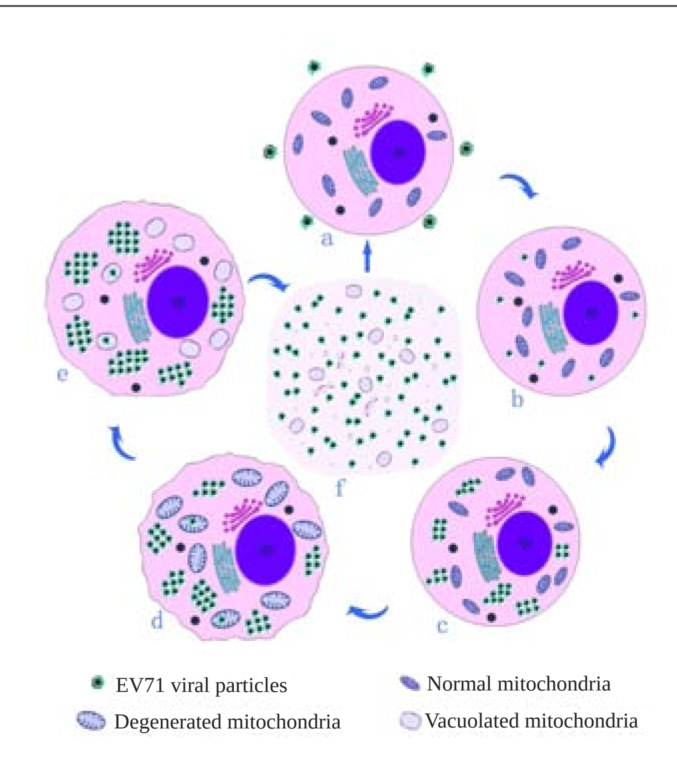


图4 EV71对Vero细胞的感染、损伤作用及其增殖循环过程

Fig.4 The process of infection, damage and proliferation of EV71 in Vero cells. a. EV71 was around the cell; b. EV71 invaded the cell; c. EV71 proliferated in the cytoplasm; d. EV71 invaded the mitochondria, leading to the degeneration; e. EV71 proliferated and the mitochondria presented vacuole; f. The infected cells progressed to disruption and released the viral particles.

径、细胞的吞噬作用还是简单弥散方式得以进入细胞？EV71又是如何侵入并损伤线粒体的？EV71除了对线粒体有直接损伤作用外，是否还具有间接损伤作用？这些问题还有待进一步研究。

参考文献：

[1] Huang CC, Liu CC, Chang YC, et al. Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection[J]. N Engl J Med, 1999, 341(13): 936-42.

[2] Mcminn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance[J]. FEMS Microbiol Rev, 2002, 26(1): 91-107.

[3] 高璐璐, 陈 清, 钟小祝, 等. 广州市某定点医院2008年5~12月手足口病收治状况及病原学研究[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(6): 1333-5.

[4] Gao L, Lin P, Liu S, et al. Pathological examinations of an enterovirus 71 infection: an autopsy case[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(8): 5236-41.

[5] Chen JF, Zhang RS, Ou XH, et al. The role of enterovirus 71 and coxsackievirus A strains in a large outbreak of hand, foot, and mouth disease in 2012 in Changsha, China[J]. Int J Infect Dis, 2014, 28: 17-25.

[6] Zhang YC, Jiang SW, Gu WZ, et al. Clinicopathologic features and molecular analysis of enterovirus 71 infection: report of an autopsy case from the epidemic of hand, foot and mouth disease in China[J]. Pathol Int, 2012, 62(8): 565-70.

[7] Reed LJ, Munch H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. Am J Hyg, 1938, 7: 493-7.

[8] 申 洪, 沈忠英. 实用生物体视学技术[M]. 广州: 中山大学出版社, 1991: 64-89.

[9] 吴正蓉, 申 洪. 大肠肿瘤组织线粒体形态结构定量研究[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 09(9): 1372-4.

[10] Wang XX, Peng W, Ren JS, et al. A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71[J]. Nat Struct Mol Biol, 2012, 19(4): 424-9.

[11] Yin YX, Xu Y, Ou ZY, et al. A simple and highly repeatable viral plaque assay for enterovirus 71[J]. J Basic Microbiol, 2015, 55(4): 538-41.

[12] 张景强. 病毒的电子显微镜研究[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 31-6.

[13] Liu CC, Guo MS, Lin FH, et al. Purification and characterization of enterovirus 71 viral particles produced from vero cells grown in a serum-free microcarrier bioreactor system[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e20005.

[14] Cheng ML, Weng SF, Kuo CH, et al. Enterovirus 71 induces mitochondrial reactive Oxygen species Generation that is required for efficient replication[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113234.

[15] Shi W, Li X, Hou X, et al. Differential apoptosis gene expressions of rhabdomyosarcoma cells in response to enterovirus 71 infection[J]. BMC Infect Dis, 2012, 12: 327.

[16] Lu JR, Lu WW, Lai JZ, et al. Calcium flux and calpain-mediated activation of the apoptosis-inducing factor contribute to enterovirus 71-induced apoptosis[J]. J Gen Virol, 2013, 94(Pt 7): 1477-85.

（编辑：吴锦雅）